

## FREEZE-DRIED VACCINE FOR HEPATITIS A

Patent Number: JP1279843  
Publication date: 1989-11-10  
Inventor(s): MORITSUGU YASUO; others: 04  
Applicant(s): YASUO MORITSUGU; others: 03  
Requested Patent: JP1279843  
Application Number: JP19880106749 19880428  
Priority Number(s):  
IPC Classification: A61K39/29 ; A61K9/14 ; A61K47/00  
EC Classification:  
Equivalents: JP2042887C, JP7061955B

---

### Abstract

---

**PURPOSE:** To obtain the subject vaccine resistant to the lowering of titer, having excellent storage stability and quickly soluble in use, by purifying a virus obtained by tissue culture, inactivating the product and freeze-drying in the presence of a stabilizing agent.

**CONSTITUTION:** A large amount of hepatitis virus A (HAV) is produced by the tissue culture using (A) GL-37 cell capable of highly producing HAV and established from the cultured kidney cell of African green monkey by cloning using a colony culture method and (B) an HAV strain KRM 003 strain separated from the feces of hepatitis A patient and having excellent sensitivity to the above cell. The obtained HAV is highly purified, inactivated, added with a stabilizing agent and freeze-dried. The stabilizing agent is 0.1-2.0% (W/V) of an amino acid such as glycine, alanine or lysine or their salt, 0.1-15% of sugars such as glucose, lactose or mannitol and 0.01-0.1% of a gelatinizing agent such as gelatin or human albumin.

Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - I2

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開  
 ⑪ 公開特許公報 (A) 平1-279843

⑩ Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号	⑪ 公開 平成1年(1989)11月10日
A 61 K 39/29 9/14 47/00	316	8829-4C D-7417-4C J-7417-4C	寄査請求 未請求 請求項の数 6 (全5頁)

⑫発明の名称 潰瘍乾燥A型肝炎ワクチン

⑬特 領 昭63-106749

⑭出 領 昭63(1988)4月29日

特許法第30条第1項適用 昭和62年11月5日、「第35回日本ウイルス学会総会」において文書をもつて発表

⑮発明者 森 次 保 雄	東京都八王子市台町1-14-23
⑯発明者 戸 塚 政 子	東京都昭島市三川町5-16-2-107
⑰出願人 森 次 保 雄	東京都八王子市台町1-14-23
⑱出願人 テンカ生研株式会社	東京都中央区日本橋兜町12-1 太洋ビル
⑲出願人 千葉 県	千葉県千葉市市場町1丁目1番地
⑳出願人 財団法人化字及血清研究所	熊本県熊本市清水町大塚668番地

⑪代理人 弁理士 简井 知  
最終頁に続く

*Alyophilized hepatitis A vaccine*

明細書

1. 発明の名称

潰瘍乾燥A型肝炎ワクチン

2. 特許請求の範囲

- (1) 損傷培養により得られたウイルス液を精製し、不活化した医薬に安定化剤を添加し、潰瘍乾燥して得られるA型肝炎ワクチンの潰瘍乾燥剤。
- (2) 安定化剤としてアミノ酸またはその塩、及び醣を添加する特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。
- (3) 安定化剤としてアミノ酸またはその塩、醣及び酵素を添加する特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。
- (4) アミノ酸またはその塩が、グリシン、アラニン、グルタミン酸ナトリウム、アルギニン及びリジンから選ばれる少なくとも1種である特許請求の範囲第(2)項記載の製剤。
- (5) 醣がグルコース、キシロース、ガラクトース、フラクトース、ラクトース、マルトース、オガカラース、マンニット、ソルビット及びキシリットから選ばれる少なくとも1種である特許請求の範囲

3. (2)項記載の製剤。

- (6) ほ気相がビラナン、ヒトアルブミンまたはデキストランである特許請求の範囲第(1)項記載の製剤

3. 発明の詳細な説明

本発明は、A型肝炎ワクチンの潰瘍乾燥剤に関する。さらによくは、組織培養法により得られたウイルスを精製し、不活化後、安定化剤の存在下で潰瘍乾燥を行うことを特徴とするA型肝炎ワクチンの潰瘍乾燥剤を提供するものである。

背景の説明

A型肝炎は、A型肝炎ウイルス(以下、HAVと略す)によって起こり、医学的にも、臨床的にも非常に重要な感染症であり、いまだ有効な治療対策が見い出されていない。そのため、このようなA型肝炎に対してもっぱら予防法が抜けされており、現在はグロブリン剤を1~3ヶ月おきに投与することが行われている。しかし、グロブリン剤中の抗HAV抗体価の低下の問題や回復後の必要性のため、ワクチンの開発が図られてきたが、まだ実用化されるまでには至っていない。

ところで、A型肝炎ワクチンは、HAVの常在地盤への潜伏者の感染を防止する効果を有していると共に、世界中いたるところで起こる散発性A型肝炎の二次感染を防止する効果を有している。これらの背景から、A型肝炎ワクチン製剤は日本国内はもとより、広く世界各地において使用可能であることが必要である。すなわち、安定性がすぐれ、長期保存に充分に耐え得る製剤の提供は必須の条件である。

本発明者は、A型肝炎患者の尿便より分離されたHAV株XRN003株とHAV感受性細胞を用いた組織培養によるウイルスを原料としてワクチンの開発を試みてきた。(第33回日本ウイルス学会年会 257頁、(1985))

通常、液状ワクチンには防腐剤が加えられており、一般的には広い抗菌スペクトルを有するナメロサールが加えられている。ところが、本発明者はワクチン開発中に、株XRN003株にナメロサールを加えるとHAV抗原活性が低下する現象を見い出した。(第35回日本ウイルス学会年会 234頁、

(1987)) さらに、あらかじめ株XRN003株にエチレンジアミン四酢酸(以下、EDTAと略す)を加えておくと抗原活性の低下が抑えられることより、前述の現象はナメロサール中の2価の水素イオンに起因するものと察せられた。しかしながら、EDTA添加はある程度効果は認められるものの完全ではなく、また、EDTAの添加は注射時に痛みを伴うことより、純EDTAを含まない他の防腐剤が好ましいと察せられた。しかし、通常の液状製剤にみられるような条件下でその主な滅菌処理を行うと、既往の過程においてカロリが低下する欠点が生じることが判明した。

#### 第四の目的

本発明者は、上記のような問題点を解決すべく既往技術を踏まえた結果、抗原活性の低下や性状の変化を伴わずに滅菌処理することを可能ならしめ、かつ乾燥品の保存安定性も液状製剤に比して飛躍的に良好となる滅菌乾燥の条件と、安定化のための製剤の配合構成とを見い出すことにより本発明を完成した。

#### 第四の開発上に留意

本発明に用いるA型肝炎ウイルスは、組織培養より得られたウイルスが使用される。HAVは長い間培養細胞で増殖出来なかつたが、1979年に至りようやくProvostとHilleman(Provost, P. J. et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 160, 213, (1979))による初の成功が報告された。彼らはムネアカハラタマリンを使ってHAVの増殖を行い、肝臓から抽出したウイルスをムネアカハラタマリンの肝臓の培養切片に接種し、初めてHAVが増殖するのを確かめるとともにアカゲザルの胎児の肝臓実験(ERhK6)でも増殖することを見出した。その後世界各地でいろいろな培養細胞を用いて検試された結果、眞先生肝癌由来の培養細胞(Alexander hepatoma cell) (Frosner, G. G. et al., Infection L, 303, (1979)), Vero細胞(Lecarnac, S. A. et al., J. Virol., 37, 216, (1981)), アフリカミドリザル肝初代は皮膚細胞(Daeer, R. J. et al., Infect. Immun., 37, 388, (1981))などでも増殖することが確かめられた。本発明者は、アフリカミドリザル

肝細胞培養上にコロニー培養法によるクローニングによって開発されたHAV感受性細胞株GL-37細胞と、同じくA型肝炎患者の尿便より分離しGL-37細胞に感受性のすぐれているHAV株XRN003株を用いた組織培養により、大量にHAVを得ることができた。

上記の方法により得られたHAVは、ポリエチレングリコール分離、超遠心、有機溶媒処理、酵素処理、グルロ糖等の生物学的活性物質の分離精製に用いられる方法の組合せにより、高度に精製して乾燥品とし、ホルマリンにて不活化した後、本発明の滅菌乾燥ワクチン製剤化に供する。

得られた不活化HAV滅菌乾燥品を用いて滅菌処理に供するには、中性附近の適当な濃度のバッファー(例えば0.01Mリン酸バッファー)中で、また好ましくはTween 80を0.302V/Vになるよう添加したバッファー中で、HAVおよび各添加物質の組成が次のようになるよう調整される。

すなわち、HAV収量は蛋白質濃度として0.05V/V以下、好ましくは0.002V/V以下含有される。添加される不活化剤としては、アミノ酸類および糖類

日本にエナジ  
ーする)を加  
へることより  
アスコイオン  
が、EDTA  
の完全では  
くを伴うこ  
用が好まし  
費用にみら  
れると、  
それが主じる

を解決すべ  
王下や性状  
乎なならし  
手に比して  
変化のた  
により本見

「ローニン  
CL-37組合  
しCL-37組  
合を用いた  
できた。」  
リエナレン  
ル、昇常速  
度指貫に  
指貫して  
た後、本  
。  
ハ復活乾燥  
バッファ  
ル、また好  
き加熱した  
の組合が次  
0.05%V/V  
る。添加  
上び初期

の一方または併せしくは双方が含まれる。アミノ酸としてはグリシン、アラニン、グルタミン酸、ナトリウム、アルギニン、リジンなどのアミノ酸またはそれらの塩が挙げられ、それらの1種もしくは2種以上を用い、通常0.1~2.0%程度、連結甙に於けるHAYE氏甙酸液中に存在させる。

酵母としては、グルコース、キシロース、ガラクトース、フラクトースなどの单糖類、ラクトース、マルトース、ツバカロースなどの二糖類、マニシット、ソルビット、キシリットなどの耐アルコール糖が挙げられ、これらの1種もしくは2種以上を用い、通常0.1~15%V/V程度が存在させる。また酵母種としてはゼラナン、ヒトアルブミン、デキストランなどが挙げられ、通常0.01~0.1%V/V程度まで存在させる。

さらに皮脂花崗ワクチソの使用時、溶解した油に生垣的に作用となるようするため中性脂を配合する。中性脂としては硬化ナトリウム、硬化カリウム、硬化マグネシウムが含まれるが、特筆すべきは硬化ナトリウムでこれに適宜、上記油の中性

さうに川端に説明する。

卷之三

GL-37培地を 10% /V/V 牛乳液培地加イーグル - E-GEN培地で 7 日 培養後、 培養シートを浮遊させ、 0.01% リン酸バッファーで洗浄後、 0.05% /V/V トリプシン、 0.02% /V/V EDTA 培地加 0.01% リン酸バッファーにて細胞をはがし、 牛胎児血清（以下 FBS と略す）を追加し、 1000 rpm で 3 分 同心してトリプシン液を除く。 出発沈淀を 8% /V/V FBS 培地加 E-GEN 培地にて浮遊させ、 この浮遊液に 4.0.1.（細胞当たりのウイルス量倍） 0.1 になるように用ウイルス液を添加させ、 37°C 1 時間後を 8% FBS 培地加 E-GEN 培地を加えて 3 ～ 4 日 培養し、 3 回 培養する。

この同じ週間に1回、2V/V<sub>1</sub> FBS混加E-NEN培地にて培地交換を行う。3週間後、培地を吸引除去し、残して0.01Mリン酸バッファーにて2回細胞を洗浄後、1V/V<sub>1</sub> NP-40（牛糞化学社製）を含む可溶化液をローラーボトル1本（容量約28）当り15ml加入し37°C1時間反応させ、HAEV感染細胞を可溶化する。可溶化液を3000rps、30回分離心し、上清を貯める。

度が添加される。これらの中性塩は0.1~3M/V/V程度、通常0.5~2M/V/V程度の濃度で含まれる。亜鉛乾燥に供すべく貯蔵されたワクチン液は、所定の包装単位に従い通常0.1ml~10mlのHAT培地を含むように小分容器に分注する。この分注量は、各温度乾燥または恒温干燥乾燥し、乾燥乾燥器とする。亜鉛乾燥の条件としては、例えば-50°C、常圧にて予備乾燥を6時間行い、次に圧力を0.003 Torr に下げ、設定温度を-15°Cから0°Cに段階的に上げ、50時間1次乾燥を行う。この時点での貯蔵温度は0°C程度である。次に25°C設定温度にて圧力0.003 Torrで20時間2次乾燥を行う。

この測定装置開発は、その組成として少なくとも  
し相應的改良済HAV抗体、安定化剤、中性脂を含  
する。

かくして得られた表面は、力性の低下がなく、その秩序安定性がよく、使用時の滑移性が運営から極めて優れたハニカムスチクサンの構造が得られる。

以下、本発明の効果と特徴及び効用により

この上清液にはHIV抗体が3~6回/日の濃度で含まれている。

2332 HAVING

上記上清液に既非活性が  $73/73$  になるようにボリエチレングリコール 6000 (和光純薬社製) を加えて40℃にて立く。一夜後にこのボリエチレングリコール滅菌液を  $80000\text{ rpm}$  で 30 分同過心し上清を得て、沈澱に  $1\text{V}/\text{V}$  EXP40 を含む可溶化バッファーを加えて沈澱を完全に再溶解し、40℃にて一夜立く。次に超音波処理し、 $15000\text{ rpm}$  15 分同過心し上清を取める。この上清には通常  $15\sim60\text{ mg}/\text{ ml}$  の HAV 活性が含まれる。この上清に等量のクロロホルムを加え室温で  $15\sim30$  分同過出処理する。 $2000\text{ rpm}$  30 分同過心し、上清にある水溶液を濾過後  $4^\circ\text{C}$  しながら減圧減圧して残存するクロロホルムを除く。

さらに終濃度で 20 μg / ml の RNase A (シグマ社製) を加え、37°C、1時間処理し、次に 5 mM 塩化マグネ

シウムと20~40μg/mlのDase I (宝酒造社製) を加えて37°Cで3時間処理する。その後、50μg/mlになるようProteinase K (メルク社製) を加えてさらに37°C、1時間処理する。2.5Mリソバッファー (pH 7.5)、エトキシエタノールとブトキシエタノールの2:1混液をそれぞれ1ml及び0.8ml加え軽く混和し、2000rpm 10分間遠心し上清液をとり、2mM EDTA、0.002% Tween 80 (和光純薬社製) 選加0.01Mリソバッファー (pH 7.4) で200~300μg/mlの抗体濃度になる様に溶解する。この抗体濃度処理操作を1~2回繰り返す。この溶液をセファクリル3400HR (ファルマシア社製) によるゲルろ過により最終抗体濃度溶液を得る。最終抗体濃度は50~100μg/mlの濃度であり、TCA (トリクロロ酢酸) ローリー法にて測定した全蛋白量に対するHIV抗体蛋白量の割合は70~100%を示す。

#### 実験例3 不活化

HIVウイルス液を0.002% Tween 30及び0.14M塩化ナトリウム選加0.01Mリソバッファー (pH 7.5)にてウイルス濃度が20μg/mlになる様に希釈

中のHIV抗体の力値をELISA法により測定し、測定後の抗体力値を1とした時の抗体力値の相対値で示した。結果を第1表に示す。

第1表

希 濃 度	抗 体 力 値 不 活 化			
	3日後	5日後	7日後	11日後
PBS-T	0.91	0.77	0.69	0.60
PBS-T+0.1% Tween 30+0.14M塩化ナトリウム	0.26	0.09	0.04	-
PBS-T+2mM EDTA+0.01%ナメロナール	0.37	0.56	0.44	0.27

PBS-T: 0.002% Tween 30, 0.14M塩化ナトリウム選加0.01Mリソバッファー (pH 7.5)

#### 実験例2

実験例3で測定したクナント液を2mlバイアルに0.5mlずつ分注し、様々な温度で凍結乾燥を行い、37°Cにおける保存安定性試験を実施した。結果を第2表に示す。

して無菌ろ過する。0.002% Tween 80選加0.01Mリソバッファー (pH 7.5) を用い1:2000希釈したホルマリンと等量混合し37°Cに12日間置く。途中8日目と12日目終了後には再び無菌ろ過する。不活化を完了したウイルス液は4°Cに保存する。

#### 実験例4 不活化

実験例3で測定した不活化特異抗体液に、アミノ酸として0.1% Tween 30+0.14M塩化ナトリウムと、ゼラチンとして5% gelatineと、ゼラチンと1% Tween 30+0.01Mリソバッファー (pH 7.5)にてクナント液を測定した。このクナント液1.5mlを2mlバイアルに入れ、-50°C減圧にて6時間子温凍結乾燥圧力を0.003Torrに下げ、設定温度を-15°Cから4°Cに段階的に上げて50時間1次乾燥し、次いで4°Cにて圧力を0.003Torrで20時間2次乾燥して不活化特異抗体液を得る。

#### 実験例5

実験例3で測定した不活化特異抗体液を瓶詰にて37°Cにおける保存安定性試験を実施した。結果

第2表

保 存 温 度	抗 体 力 値 不 活 化				抗 体 力 値 不 活 化	
	1週間後	3週間後	5週間後	11週後		
① PBS-T	1.00	0.16	×	○	0.02	-
② PBS-T+5% gelatine+0.5% Tween 30+0.01Mリソバッファー (pH 7.5)	1.00	0.70	○	○	0.37	0.33
③ ○+0.5% Tween 30	1.00	0.92	○	○	0.90	0.36
④ ○+0.5% Tween 30	1.00	0.92	○	○	0.90	0.36
⑤ ○+0.5% Tween 30	1.00	0.92	○	○	0.90	0.36

① PBS-T

② PBS-T+5% gelatine+0.5% Tween 30+0.01Mリソバッファー (pH 7.5)

③ ○+0.5% Tween 30

#### 実験例6

実験例4に記したものと同様の方法によって得られた凍結乾燥品の、保存安定性試験を実施した。凍結乾燥後の抗体力値を1とした時の抗体力値の相対値で示した。結果を第3表に示す。

第3表

保 存 温 度	抗 体 力 値 不 活 化					
	1週間後	3週間後	5週間後	9週間後	13週間後	17週間後
25°C	0.99	1.15	0.98	1.16	1.12	NT*
37°C	0.91	0.90	0.54	0.30	0.75	0.64
45°C	0.90	0.63	0.62	0.60	0.54	NT*

\* not tested

